

**Beiträge zum biosynthetischen Einbau C¹⁴ -
markierter niederer Fettsäuren
in Fettsäuren höherer Kettenlänge**

KARLHEINZ DESING



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

**Beiträge zum biosynthetischen Einbau C^{14} -
markierter niederer Fettsäuren
in Fettsäuren höherer Kettenlänge**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München



vorgelegt von
KARLHEINZ DESING
aus Weiden/Opf.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. W. SEITZ

Dekan : Professor Dr. W. BUNGELER

Tag der mündlichen Prüfung: 26. VI. 1958

Herrn Prof. Dr. W. Seitz darf ich für die freundliche Überlassung des Themas meinen ergebenen Dank aussprechen. Sehr zu Dank verpflichtet bin ich Frau Dr. Dr. Vera von Brand für die wertvollen Anregungen. Herr Prof. Dr. Stefan Goldschmidt gab mir die Möglichkeit, einen Teil der Versuche im Biochemischen Laboratorium des Org.-chemischen Institutes der Technischen Hochschule München durchzuführen. Ihm und Herrn Dr. Heinrich Rehberg möchte ich für ihre wertvolle Unterstützung besonders danken.

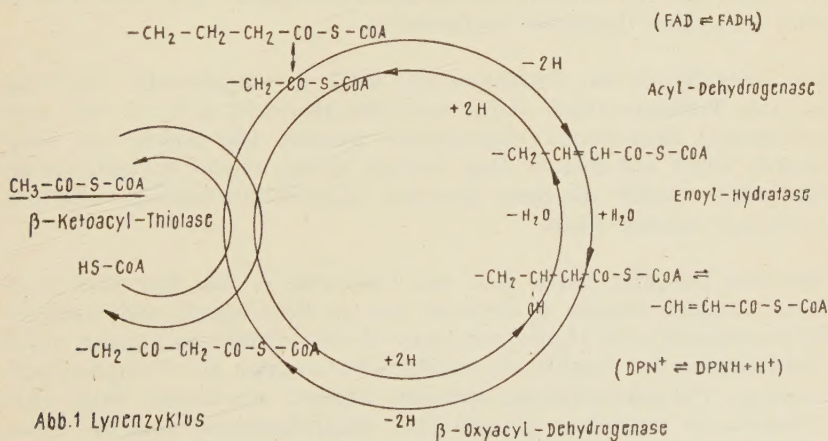
AUFGABENSTELLUNG

R. O. Brady und S. Gurin (1) haben in einer früheren Arbeit gefunden, daß ein aus der Leber junger Tauben präpariertes zellfreies, wasserlösliches Enzymsystem imstande ist, C^{14} -markiertes Acetat in höhere Fettsäureketten einzubauen. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Fettsäuren bei der Synthese aus Acetat entstehen und ferner, ob statt des C^{14} -markierten Acetats als Substrat zugesetzte andere, niedere C^{14} -markierte Fettsäuren, wie Buttersäure, Capronsäure und Caprylsäure, ebenfalls zum Aufbau höherer Fettsäureketten dienen können und möglicherweise einen Einfluß auf die Zusammensetzung des entstehenden Fettsäuregemisches haben.

Wir verwendeten daher zur Synthese der höheren Fettsäuren das nach der Vorschrift von R. O. Brady und S. Gurin aus Taubenleber dargestellte zellfreie, wasserlösliche Enzymsystem und analysierten das durch Biosynthese entstandene Gemisch höherer Fettsäuren mit Hilfe der Papierchromatographie.

THEORETISCHER TEIL

Von Knoop (2) war das Prinzip der β -Oxydation als Grundlage des Fettsäureabbaus erkannt worden. Doch erst durch die Entdeckung des Coenzym A, das von Lipmann (3) u. a. gefunden wurde, konnten hauptsächlich von Lynen und Mitarbeitern in letzter Zeit grundlegende Erkenntnisse bezüglich des Fettstoffwechsels gewonnen werden. Die Arbeiten von Lipmann führten zu der Vorstellung, die dann auch von Stadtmann (4), Ochoa (5) und Lynen bestätigt werden konnte, daß die sogenannte „aktivierte Essigsäure“, jenes C_2 -Bruchstück, das sowohl bei der β -Oxydation der Fettsäuren, als auch bei der biologischen Oxydation der Kohlehydrate gebildet wird, ein Derivat aus Essigsäure und Coenzym A sei. Lynen, Reichert und Rueff (6) isolierten aus Hefezellen eine Substanz mit den Eigenschaften der „aktivierten Essigsäure“ und zeigten, daß es sich dabei um den Thioester aus Essigsäure und Coenzym A handelt. Nachdem die chemische Struktur der „aktivierten Essigsäure“ ermittelt war und außerdem auch die Isolierung der an den einzelnen Umsetzungen des Fettsäureaufbaus beteiligten Enzyme in hochgereinigter Form gelungen war, konnte Lynen (7,8) den Prozeß, nach welchem einerseits die Fettsäureketten in C_2 -Bruchstücke aufgespalten und andererseits C_2 -Bruchstücke zu Fettsäureketten aufgebaut werden, in dem nach ihm benannten Fettsäurezyklus zusammenfassen.

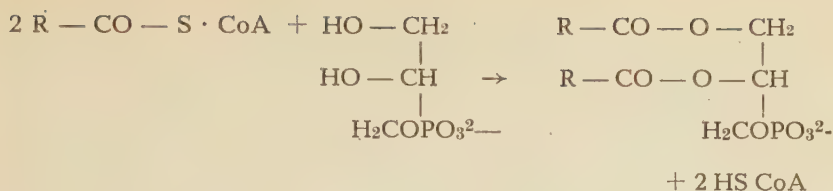


Die Voraussetzung für den biologischen Umsatz der Fettsäuren ist, daß diese in ihrer „aktivierten“ Form, d. h. in Verbindung mit dem Coenzym A vorliegen. Für diesen Aktivierungsprozeß wird Adenosintriphosphat (ATP) benötigt (9), durch dessen Spaltung die Energie für die Überführung der Fettsäuren in die Thioester von Coenzym A zur Verfügung gestellt wird. Der Fettsäurezyklus, der beim Aufbau der Fettsäurekette aus Acetyl-CoA durchlaufen werden muß, umfaßt vier Schritte. Er beginnt mit der durch die β -Ketoacyl-Thiolase katalysierten Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA. Darauf erfolgt unter dem Einfluß der β -Oxyacyl-Dehydrogenase die Reduktion des Acetoacetyl-CoA zur entsprechenden β -Oxy-Verbindung, dem L- β -Oxybutyryl-CoA. Der dazu benötigte Wasserstoff stammt von hydriertem Diphospho-pyridin-nucleotid (DPNH), der Cozymase I. Nun findet eine Wasserabspaltung von L- β -Oxybutyryl-CoA statt, ein Vorgang, der an das Enzym Enoyl-Hydratase gebunden ist. Als letzter Schritt folgt darauf die Hydrierung von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA durch die Acyl-Dehydrogenase, wobei als wasserstoffübertragendes Coferment Flavinadenindinucleotid dient.

Nach diesen vier Schritten ist der Zyklus einmal durchlaufen mit dem Ergebnis, daß die Kohlenstoffkette des Acetyl-CoA um zwei Kohlenstoffatome verlängert ist, wozu ein Molekül Coenzym A und vier Wasserstoffatome benötigt wurden. Das gebildete Butyryl-CoA kann sich nun mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA kondensieren und liefert dann in einem nochmaligen Umlauf des Lynen-Zyklus Capronyl-CoA. Die 18 C-Atome umfassende Stearinsäure z. B. wird also in acht derartigen Umläufen synthetisiert.

Die β -Oxydation der Fettsäurekette läuft in umgekehrter Richtung ab. Die Fettsäure muß dafür zunächst aktiviert, d. h. in das entsprechende CoA-Derivat übergeführt werden. Der Abbau der Fettsäuren führt auf diesem Weg letzten Endes wieder zur aktivierten Essigsäure zurück, die dann über den Zitronensäurezyklus endgültig verbrannt werden kann.

Bei dem Vorgang, durch den das Coenzym A aus den Acyl-CoA-Verbindungen wieder in Freiheit gesetzt wird, spielt nach neueren Erkenntnissen eine Hydrolyse keine Rolle, sondern es können durch Übertragung der Acyl-Reste auf die OH-Gruppen der Phosphoglycerinsäure Phosphatidsäuren gebildet werden, aus denen dann echte Phosphatide entstehen können (10). Möglicherweise sind die Phosphatidsäuren auch Zwischenprodukte beim Aufbau der echten Fette.



Kornberg und Pricer (11) konnten in der Leber ein Säurereste übertragendes Enzym nachweisen, das ein ausgesprochenes Wirksamkeitsoptimum für die Derivate der Fettsäuren mit 16—18 Kohlenstoffatomen, also der Palmitin-, Stearin-, und Ölsäure besaß. Damit könnte unter Umständen das bevorzugte Auftreten gerade dieser Säuren im tierischen Organismus eine Erklärung finden. Durch diese Enzyme werden aus der Reihe der verschiedenen, den Bereich von C₄ bis hinauf zu C₁₈ und höher umspannenden Fettsäure-CoA-Thioester, die während der Biosynthese nebeneinander vorhanden sind, vorwiegend Palmitin-, Stearin- und Ölsäure auf Glycerin übertragen, so daß gerade diese Säuren durch den Fettsäurezyklus laufend nachgeliefert werden müssen.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Biologische Fettsynthese durch ein zellfreies, wasserlösliches Enzymsystem.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Synthese der höheren Fettsäuren aus C^{14} -markiertem Acetat, bzw. C^{14} -Butyrat, C^{14} -Capronat oder C^{14} -markiertem Caprylat, durch ein wasserlösliches, zellfreies Enzymsystem aus Taubenleber. Dieses Enzymsystem, das gemäß der Angabe von R. O. Brady und S. Gurin (1) in einem durch hochtouriges Zentrifugieren von Taubenleberhomogenaten gewonnenem klaren Überstand (supernatant-fluid) gefunden wird und auf Grund einer schonenden Aufarbeitung alle für die Fettsynthese benötigten Coenzyme in ausreichender Konzentration enthält, bedarf mit Ausnahme der Pyridincofermente, sowie von aktivierenden Ionen keiner weiteren Substitution mehr. Da es bei unseren Untersuchungen darauf ankam, eine jeweils möglichst hohe Fettsynthese zu erzielen, machten wir uns weitgehend die Ergebnisse einer von V. v. Brand und E. Helmreich (12) durchgeführten Untersuchung über die Beziehungen der Glycolyse zum Fettstoffwechsel zunutze. So fanden v. Brand und Helmreich, daß nur ein ausreichender glycolytischer Umsatz eine Fettsynthese ermöglicht. Sobald die Tauben 48 Stunden vor dem Töten hungern, verliert das aus deren Leber dargestellte Enzymsystem die Fähigkeit, aus C^{14} -Acetat höhere Fettsäureketten aufzubauen. Ferner konnten v. Brand und Helmreich zeigen, daß sich die Aktivität des Enzymsystems durch Zusatz von DPN bzw. DPNH, dessen Rolle als Wasserstoffdonator im Fettsäurezyklus aus dem Schema von Lynen hervorgeht, bedeutend steigern läßt. Die größte Steigerung der Fettsynthese konnten sie unter anaeroben Bedingungen und durch den Zusatz von DPNH erzielen. Auf den Einfluß bestimmter, aktivierender Ionen wiesen bereits Brady und Gurin hin. Auch in der Arbeit von v. Brand und Helmreich wird bestätigt, daß Mg^{++} Ionen das Enzymsystem aktivieren, und zwar ist eine Konzentration von 0,006 m optimal. Desgleichen fördert Natriumcitrat in einer Konzentration von 0,01 m unter aeroben und anaeroben Bedingungen den Einbau von C^{14} -Acetat in höhere Fettsäuren in Anwesenheit von DPN oder DPNH. Nach v. Brand und Helmreich führt möglicherweise Citrat als Substrat einer im Überstand (supernatant) befindlichen DPN-abhängigen Isocitricohydrogenase zur erhöhten Bildung von DPNH.

1. Darstellung des Enzymsystems.

Die Darstellung des fettsynthetisierenden, zellfreien, wasserlöslichen

Enzymsystems erfolgte aus der Leber junger Tauben, in Anlehnung an die Vorschrift von R. O. Brady und S. Gurin (1).

Jungen, 4—6 Monate alten Tauben, die zuvor reichlich mit Weizenkörnern gefüttert worden sind, werden vor dem Töten jeweils im Abstand von einer Stunde einmal ca. 7 ml einer 50%igen Fructoselösung und dreimal je ca. 7 ml einer 50%igen Glucoselösung mit einer Pipette in den Kropf instilliert. Eine Stunde nach der letzten Verabreichung von Glucoselösung werden die Tauben mit einem Scherenschlag dekapitiert, die Leber sofort herauspräpariert und in Eiswasser gewaschen.

Die Leber wird mit dem 1,5fachen Volumen an Phosphat-Bicarbonat-Puffer, pH 7,4, bei 0° C mit einem Glashomogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Ein Gramm Leber entspricht einem Volumen von 0,8 ml Wasser.

Pufferzusammensetzung:

1 Teil 0,008 m KH_2PO_4

1 Teil 0,085 m K_2HPO_4

1 Teil 0,07 m KHCO_3

Das Homogenat wird bei 2000—3000 U/min (d. s. 1250×g) in der Kälte 45 Minuten zentrifugiert (Christ-Zentrifuge, Fa. Textor) und der Rückstand, der aus den groben Zelltrümmern besteht verworfen. Der Überstand wird bei 15000 U/min (25000×g) hochtourig 30 Minuten zentrifugiert (Runne-Zentrifuge). Der Rückstand wird wieder verworfen und der Überstand mit Phosphat-Bicarbonatpuffer auf das gewünschte Volumen verdünnt, wobei pro Gramm Leber maximal 2,4 ml Pufferlösung zugegeben werden. Nun wird noch einmal bei 15000 U/min 45 Minuten zentrifugiert und von dem Überstand (supernatant-fluid) 2,4 ml pro Versuchsansatz verwendet. Alle Vorgänge erfolgen streng bei 0° C.

Der Eiweißgehalt des auf diese Weise präparierten Enzymsystems wurde bestimmt nach einem auf dem Prinzip der Biuret-Probe beruhenden Verfahren (13). Er betrug im Mittel $24,4 \pm 2$ mg%.

Da die Untersuchungen von v. Brand und Helmreich ergaben, daß die Aktivität der in der löslichen Phase enthaltenen Enzyme, die mit allen Cofaktoren versehen sind, durch den Zusatz eines die Mitochondrien enthaltenden Trockenpulvers nicht erhöht wird, sondern die Durchschnittswerte der Versuche, die mit der löslichen Phase des Enzymsystems allein durchgeführt wurden, bei Anwesenheit von DPNH sogar um etwa 25% höher lagen als die Mittelwerte der entsprechenden Versuche mit Zusatz von Mitochondrientrockenpulver,

verzichteten wir im Verlauf unserer Untersuchungen auf die Darstellung eines Mitochondrientrockenpulvers und verwendeten für den biologischen Ansatz nur die lösliche Phase des Enzymsystems (supernatant-fluid).

2. Inkubation:

Biologischer Ansatz		Molarität im Endvolumen*)	
Wasserlöst. Phase des Enzymsystems 2,4 ml			
Na-Citrat		1·10 ⁻²	
MgCl ₂		6·10 ⁻³	
Cytochrom c		5·10 ⁻⁵	
DPN		0,8·10 ⁻³	
0,4 ml der Lösung des C ¹⁴ -markierten fettsauren Salzes; je nach Art des Versuches:		Aktivität Imp / min	
Na-Acetat	2 mg	8·10 ⁻³	1,7·10 ⁵
Na-Butyrat	5,5	1,6·10 ⁻²	1,7·10 ⁵
Na-Capronat	7,0	1,7·10 ⁻²	1,0·10 ⁵
Na-Caprylat	8,4	1,7·10 ⁻²	4,0·10 ⁴

*) Endvolumen: 3,0 ml

Der pH-Wert der Ansätze, der während der Inkubation annähernd konstant bleibt, beträgt 7,2—7,4.

Die Ansätze werden in Warburg-Kölbchen größeren Volumens (Fassungsvermögen: 20 ml) im Warburg 4 Stunden bei 38±0,1° C unter aeroben Bedingungen (Gasphase: Luft) inkubiert.

Die Darstellung der C¹⁴-markierten fettsauren Salze erfolgte nach einem von W. Lamprecht und H. Rehberg angegebenen Verfahren (Hoppe-Seylers Z. f. physiol. Chem. 301, 46, 1955) im Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München.

3. Verseifung:

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die 3,0 ml Reaktionsmischung mit 5 ml destilliertem Wasser in ein birnenförmiges Schliffkölbchen gespült und mit 5 ml einer 30%igen alkoholischen Kalilauge 4 Stunden unter Rückfluß bei gelinden Sieden verseift. Die abgekühlte Verseifungslösung wird in einem Schütteltrichter mit

15—20 ml Petroläther (Sdp. 30—50° C) vermischt und mit etwa 19%iger Salzsäure angesäuert. Die Fettsäuren werden durch viermaliges Ausschütteln in Petroläther aufgenommen. Diese Petrolätherlösung enthält die synthetisierten Fettsäuren, sowie auch die des Depotfettes.

II. *Papierchromatographische Trennung der durch Biosynthese entstandenen Fettsäuren.*

1. Theoretische Vorbemerkungen.

Die Papierchromatographie ermöglicht es, die Trennung kleinster Mengen Fettsäuren, wie sie bei der Biosynthese entstehen, vorzunehmen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Fettsäuren in Form ihrer entsprechenden Hydroxamsäuren auf acetyliertem Papier chromatographiert. Die Chromatographie mit Hilfe von acetyliertem Papier wurde zuerst von Kostir und Slavik (14) und Neimann und Mitarbeitern (15) zur Trennung von Dinitrophenylhydrazonen organischer Carbonylverbindungen beschrieben. Michael und Schweppe (16) trennten mit einem auf diese Weise präparierten Papier neben anderen hydrophoben Substanzen auch Fettsäuren. In dieser Arbeit wurde diese Methode, die von H. Rehberg (17) auch zu einer quantitativen Bestimmung durch Kolorimetrie der getrennten und eluierten Hydroxamsäuren ausgebaut wurde, übernommen. Diese Art der Chromatographie entspricht einer Verteilungschromatographie mit umgekehrten Phasen, wobei das Papier durch die Acetylierung hydrophob gemacht wird und nun als stationäre Phase den unpolaren Anteil des Lösungsmittelgemisches bindet. Als Lösungsmittel, d. h. als bewegliche Phase, werden dann polare Flüssigkeiten verwandt. Beim normalen Papierchromatogramm bindet die hydrophile Cellulose mittels ihrer Hydroxylgruppen den polaren Lösungsmittelanteil, weshalb auf diese Weise im Wesentlichen nur einigermaßen wasserlösliche Stoffe chromatographiert werden können. Auf dem acetyliertem Papier werden Fettsäuren als Hydroxamsäuren getrennt, da die Überführung in die entsprechenden Hydroxamsäuren leicht und nahezu quantitativ durchzuführen ist und diese in Form rot gefärbter Eisenkomplexe einfach und sicher nachzuweisen sind.

Da die Rf-Werte der Ölsäure und der um zwei C-Atome kürzeren Palmitinsäure nahezu gleich sind, lassen sich diese nicht trennen. Da aber in biologischen Fettsäuregemischen immer mit dem Vorkommen von Ölsäure zu rechnen ist, war es erforderlich, eine von H. Rehberg entwickelte Methode zur Trennung der beiden Fettsäuren zur Anwendung zu bringen. Durch die Einführung von Hydro-

xylgruppen in das Molekül der ungesättigten Ölsäure wird diese hydrophiler, und der Rf-Wert dieser nun 9,10-Dihydroxystearinsäure kommt nun in die Größenordnung nicht zu erwartender Säuren niederer oder mittlerer Kettenlänge. Durch Hydroxylierung des durch Biosynthese entstandenen Fettsäuregemisches gelingt die Trennung der ungesättigten Ölsäure durch ihre Überführung in 9,10-Dihydroxystearinsäure von der gesättigten, um zwei C-Atome kürzeren Palmitinsäure.

2. Beschreibung der chromatographischen Trennung der durch Biosynthese entstandenen Fettsäuren.

Die aus dem biologischen Ansatz nach der Verseifung erhaltenen Petrolätherauszüge werden durch vorsichtiges Eindunsten auf ein Volumen von etwa 0,5 ml gebracht und hydroxyliert, um eine Trennung der gesättigten von den ungesättigten Fettsäuren erzielen zu können. Das hydroxylierte Fettsäuregemisch wird im Anschluß daran mit Diazomethan verestert, die Fettsäureester werden mit Hydroxylamin in die entsprechenden Hydroxamsäuren umgewandelt. Die auf diese Weise erhaltenen Fettsäurehydroxamate können nun durch Chromatographie auf acetyliertem Papier getrennt werden.

a) Hydroxylierung:

Die nach dem vorsichtigen Abdampfen des Petroläthers erhaltenen Fettsäuregemische werden pro Ansatz mit je 1 ml 99%iger Ameisensäure, 1 ml Ameisensäureäthylester und 0,25 ml 30%igem Wasserstoffperoxyd versetzt, und die Mischung 3 Stunden auf 50° C in einem Thermostaten erwärmt, wobei die Hydroxylierung der ungesättigten Säuren eintritt. Danach wird die Lösung vorsichtig abgedampft.

b) Veresterung:

Die hydroxylierten Ansätze werden in etwas Äther aufgenommen und mit 5 ml einer getrockneten ätherischen Diazomethanolösung versetzt, wobei Stickstoffentwicklung die Reaktion anzeigt. Sollte die gelbe Farbe der Diazomethanolösung innerhalb von 2—3 Min. verschwunden sein, so werden weiter 5 ml dieser Lösung zugegeben. Die Ansätze läßt man zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehen

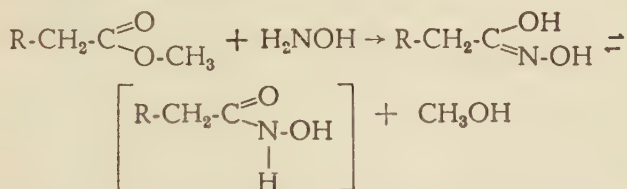


Die zur Verwendung kommende Diazomethanolösung wird jeweils frisch bereitet: 2,5 g Nitrosomethylharnstoff werden in 6 ml einer stark gekühlten 40%igen NaOH, die mit 25 ml Äther überschichtet

ist, in kleinen Portionen eingebracht. Die ätherische Diazomethanolösung wird nach beendeter Reaktion abdekantiert und über einigen Stückchen Ätzkali getrocknet.

c) Überführung in die Hydroxamsäuren:

Die ätherische Lösung der Fettsäuremethylester wird mit einer kleinen Füllkörperkolonne auf ein Volumen von etwa 0,5 ml gebracht und zur Überführung in die Hydroxamsäuren pro Ansatz mit 3 ml einer methanolischen Hydroxylaminlösung versetzt. Man erhitzt 1—2 min auf dem siedenden Wasserbad und läßt dann 10—15 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. (Die Hydroxylaminlösung erhält man durch Zusammengießen von 1 ml einer 1-n methanolischen Hydroxylaminhydrochloridlösung mit 2 ml einer 1-n methanolischen KOH. Man kühlt auf 0° C ab und filtert die entstandene Hydroxylaminlösung vom ausgefallenen KCl ab.)



Die Lösungen werden mit Tetrahydrofuran-Eisessig im Verhältnis 4:1 schwach angesäuert und stehen nun zur chromatographischen Trennung bereit.

d) Trennung der Hydroxamsäuren:

Die Trennung erfolgt auf acetyliertem Papier mit einem Acetylgehalt von 18—28% (Fa. Schleicher & Schüll 2043b). Als Lösungsmittelgemisch wurde Essigester/Tetrahydrofuran/Wasser im Verhältnis 1/6/8 verwendet.

Auf einem Bogen acetylierten Papiers der Größe 18×55 cm wird im Abstand von 4 cm vom unteren Rand des Bogens die Startlinie markiert und mit einer Mikropipette (Elphor-Pipette, Fa. Wagner & Munz) von 10 mm³ Inhalt auf einer Breite von 3 cm ca. 50 mm³ der erhaltenen Hydroxamsäurelösung strichförmig aufgetragen. Im Abstand von jeweils 2 cm wird die nächste zu analysierende Hydroxamsäurelösung aufgebracht. Zum Vergleich und zur Identifizierung wird außerdem ein Modellgemisch von Hydroxamsäuren bekannter Zusammensetzung mitlaufen gelassen. Die auf diese Weise zur Chromatographie vorbereiteten Bögen werden an der Luft getrocknet und anschließend in den Chromatographietrog gebracht, ohne dabei den

Boden des Gefäßes zu berühren, der mit etwa 100 cm³ des Lösungsmittelgemisches bedeckt ist. Nach Einstellung eines Gleichgewichtszustandes der Sättigung des Papiers, der in unserem Falle etwa nach 5 Stunden erreicht wird, wird der Bogen etwas tiefer gehängt, so daß er etwa einen halben Zentimeter in das Lösungsmittelgemisch eintaucht, und die Chromatographie nach der „aufsteigenden Methode“ beginnt. Nach etwa 20 Stunden erreicht die Lösungsmittelfront eine Höhe von 35 cm und die Bögen werden aus dem Trog entfernt. Die Lage der Lösungsmittelfront wird mit Bleistift markiert und das Chromatogramm an der Luft getrocknet.

e) Indizierung der getrennten Hydroxamsäuren:

Nach dem Trocknen werden die Chromatogramme mit Hilfe eines Glaszerstäubers und einem kleinen Gebläse mit einer 2%igen Lösung von Eisen-3-chlorid in n-Butanol gleichmäßig besprüht. Die FeCl₃-Lösung wird mit HCl leicht angesäuert. Auf dem Chromatogramm erscheinen die Hydroxamsäuren in Form von Eisenkomplexen als rote bis violette Flecken.

III. Nachweis und Bestimmung der synthetisierten C¹⁴-markierten Fettsäuren.

Auf dem Chromatogramm erscheinen sowohl die Fettsäuren, die aus dem Depotfett der Taubenleber stammen, als auch diejenigen Fettsäuren, die durch Biosynthese aus den als Substrat zugesetzten C¹⁴-markierten niederen Fettsäuren gebildet wurden. Um den Einbau der zugesetzten radioaktiv markierten Substrate in höhere Fettsäuren nachzuweisen, kamen die im Folgenden beschriebenen Methoden zur Anwendung.

1) Autoradiographie:

Die Chromatogramme werden in Streifen der Größe eines Röntgenfilmes (Perutz, Typ S mit normalem Kontrast) geschnitten und mit diesem bedeckt. Die mit den Filmen bedeckten Streifen werden in lichtundurchlässiges, schwarzes Papier eingewickelt und zwischen zwei Glasplatten gelegt, die mit Eisenplatten beschwert sind. Die Expositionszeit beträgt 2—3 Wochen. Anschließend werden die Röntgenfilme entwickelt.

Auf dem Röntgenfilm erscheinen sowohl die synthetisierten Fettsäuren als auch die als Substrat verwendeten, soweit sie nicht zur Synthese der höheren Fettsäuren herangezogen und in diese eingebaut wurden, als mehr oder weniger stark geschwärzte Flecken. (Eine Ausnahme macht hier nur die Essigsäure, die infolge ihrer guten Wasser-

löslichkeit bei dem nach der Verseifung erfolgenden Ausschütteln mit Petroläther nicht in diesen übergeht.) Die Größe und Intensität der geschwärzten Flächen kann als proportional den vorhandenen, radioaktiv markierten Fettsäuren angesehen werden, wenn man den Schwarzschild-Exponenten der verwendeten Emulsion des Filmes berücksichtigt. Die Schwärzung entspricht dann dem Produkt $S = I^q \cdot t$, wobei S die Schwärzung, I die Intensität der Strahlung und t die Belichtungszeit bedeuten. Der Schwarzschild-Exponent (des verwendeten Filmes) q beträgt: 0,95.

2) Radiopapierchromatograph:

Neben der Autoradiographie kam, besonders zur quantitativen Bestimmung der auf die einzelnen durch Biosynthese entstandenen Fettsäuren verteilten Aktivität, folgende Methode zur Anwendung. Mit einem Radiopapierchromatographen der Fa. Frieseke & Hoepfner, Erlangen läßt sich ein Chromatogramm entweder kontinuierlich mit einem Schreiber oder schrittweise mit vorgewählter Impulszahl und einem Zeitdrucker quantitativ auswerten. Im ersten Fall erhält man das Ergebnis bereits als Kurve graphisch durch den Schreiber festgehalten, wobei die Genauigkeit mit steigender Aktivität der Flecken wächst. (Fehler = $a \sqrt{n}$, wobei n die Anzahl der Impulse pro Zeiteinheit und a den Wahrscheinlichkeitsfaktor bedeutet.) Bei sehr schwachen Aktivitäten führt die zweite Art der Messung zu genaueren Resultaten. Bezüglich der genauen Handhabung der angeführten Geräte sei auf die Gebrauchsanleitung der Firma Frieseke & Hoepfner, Erlangen, verwiesen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Versuche über den Einbau von C^{14} -markiertem Na-Acetat in höhere Fettsäuren (6 Versuche).

Das biosynthetisch entstandene Fettsäuregemisch wurde nach der im vorhergehenden Teil ausführlich beschriebenen Methode chromatographisch getrennt, und die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen durch Biosynthese entstandenen Fettsäuren autoradiographisch bestimmt. Um größere, faßbare Mengen an Fettsäuren zu erhalten, wurden nach der Verseifung jeweils durchschnittlich die Petrolätherauszüge von 6 Versuchsansätzen vereinigt und zusammen chromatographiert.

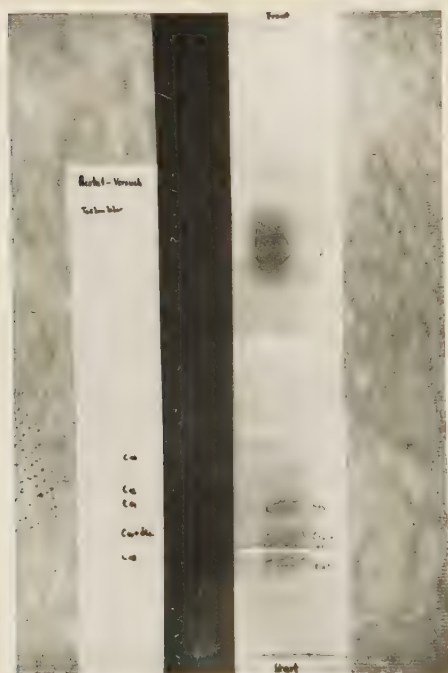


Abb. 2: Die Abbildung zeigt rechts den Chromatographiebogen mit den getrennten, den einzelnen Fettsäuren entsprechenden Hydroxamsäuren, die mit $FeCl_3$ -Lösung indiziert sind. Links davon den Röntgenfilm, mit dem das Chromatogramm bedeckt war und auf dem diejenigen Fettsäuren, zu deren Synthese das C^{14} -markierte Acetat herangezogen wurde, Schwärzungen hervorgerufen haben.

Im Mittel wurden bei unseren Versuchen etwa 15% des eingesetzten C^{14} -markierten Acetates in höhere Fettsäuren eingebaut. Unter den gegebenen Bedingungen wurde es zur Synthese von Caprin-, Lau-

rin-, Myristin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure herangezogen. Wie aus der Abb. 2 ersichtlich ist, wurde das als Substrat eingesetzte C^{14} -markierte Acetat fast ausschließlich zur Synthese der Palmitin-, Stearin- und Ölsäure (zusammen etwa 96%) herangezogen, also jener Säuren, die auch normalerweise im Taubenleberfett bevorzugt vorkommen.

Die bevorzugte Bildung von Fettsäuren höherer Kettenlänge überrascht nicht, da durch Untersuchungen von Green, Mahler, Crane und Mitarbeitern (18—22) drei Acyl-Dehydrogenasen isoliert werden konnten, die spezifisch auf Fettsäuren bestimmter Kettenlänge eingestellt sind. Ferner dürfte eine Rolle spielen, daß nach den Untersuchungen von Kornberg und Pricer (11) gerade die Säurereste der Fettsäuren mit 16—18 Kohlenstoffatomen bevorzugt auf die OH-Gruppen der Phosphoglycerinsäure übertragen und somit aus dem Gleichgewicht gezogen werden. Dadurch müssen gerade diese Säuren laufend durch den Fettsäurezyklus nachgeliefert werden.

2. Versuche über den Einbau von C^{14} -markiertem Na-Butyrat in höhere Fettsäuren (4 Versuche).

Tab. 1 Versuche mit C^{14} -markiertem Na-Butyrat.

Vers. Nr.	Substrat in mg	Eingesetzte Radio- aktivität (Imp/min)	In höh. Fetts. gef. Radioaktiv (Imp/min)
1	C^{14} -Butyrat 5,5	170000	0*)
1a	C^{14} -Acetat 2,0	170000	19170**)
2	C^{14} -Butyrat 5,5	170000	0
3	C^{14} -Butyrat 5,5	170000	0
3a	C^{14} -Acetat 2,0	170000	23320
4	C^{14} -Butyrat 5,5	170000	0

*) Die Auswertung der Versuche mit Butyrat erfolgte durch Chromatographie des aus dem Ansatz erhaltenen Fettsäuregemisches und Autoradiographie der Chromatogramme.

**) Die Versuche 1a und 3a sind Parallelversuche mit Acetat zu den Versuchen Nr. 1 und 3. Es fand bei den Versuchen mit Acetat das gleiche Enzymsystem Verwendung wie bei den entsprechenden Versuchen mit Butyrat. Der Nachweis des Einbaus des C^{14} -markierten Acetats erfolgte hier durch Messung der Radioaktivität der gesamten aus den Versuchsansätzen isolierten höheren Fettsäuren nach der Methode von C. Entenman u. a. (23). Vom Petrolätherauszug, der die synthetisierten, höheren Fettsäuren enthält und der durch vorsichtiges Eindampfen auf 10 ml gebracht wurde, wurde 1 ml auf sog. „Lenspaper“ aufgetropft. Als

Unterlage fanden Aluminiumplättchen mit Rand (ϕ 2,5 cm) Verwendung. Die Messung der Radioaktivität dieses aliquoten Teiles der isolierten Fettsäuren erfolgte mit einem Fensterzählrohr dünner Belegung (1 mg/cm²) (Fa. Frieseke & Hoepfner).

Ein Einbau von C¹⁴-markiertem Butyrat konnte unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen nicht erzielt werden. Die auf dem Chromatogramm erscheinenden, den einzelnen Fettsäuren entsprechenden Hydroxamsäuren erwiesen sich als nicht radioaktiv; sie stammten demnach aus dem Depotfett der Taubenleber. Eine Ausnahme bildet die als Substrat zugesetzte C¹⁴-markierte Buttersäure, die auf dem Chromatogramm erschien und eine Schwärzung des aufgelegten Röntgenfilms hervorrief. Das für die Synthese verwendete Enzymsystem war aber durchaus imstande, C¹⁴-markiertes Acetat zum Aufbau höherer Fettsäuren heranzuziehen, wie sich aus Vergleichsansätzen mit C¹⁴-markiertem Acetat, das anstelle von C¹⁴-markiertem Butyrat als Substrat zugesetzt wurde, ergab.

3. Versuche über den Einbau von C¹⁴-markiertem Na-Capronat in höhere Fettsäuren (4 Versuche).

Auch bei den Versuchen, bei denen C¹⁴-markiertes Na-Capronat als Substrat Verwendung fand, konnte unter den von uns gewählten Bedingungen kein Einbau in höhere Fettsäuren erzielt werden. Das Enzymsystem war aber, wie auch bei den Versuchen mit C¹⁴-markiertem Na-Butyrat, durchaus in der Lage, C¹⁴-markiertes Acetat zum Aufbau höherer Fettsäuren heranzuziehen, wie aus Parallelansätzen hervorging.

Tab. 2: Versuche mit C¹⁴-markiertem Na-Capronat:

Vers. Nr.	Substrat in mg	Eingesetzte Radio- aktiv. (Imp/min)	In höh. Fetts. gef. Radioaktiv. Imp/min)
1	C ¹⁴ -Capronat 7,0	100000	0
1a	C ¹⁴ -Acetat 2,0	170000	35490
2	C ¹⁴ -Capronat 7,0	100000	0
3	C ¹⁴ -Capronat 7,0	100000	0
3a	C ¹⁴ -Acetat 2,0	170000	23320
4	C ¹⁴ -Capronat 7,0	100000	0

4. Versuche über den Einbau von C¹⁴-markiertem Na-Caprylat in höhere Fettsäuren (10 Versuche).

Diese Versuche ergaben einen Einbau der Substrate in höhere Fett-

säuren, wie aus der Abb. 3 hervorgeht. Auffallend ist die Bevorzugung der Synthese von Palmitinsäure. Neben der Palmitinsäure wurden jedoch auch Stearin- und Ölsäure synthetisiert. In diesen höheren Fettsäuren wurden allerdings geringere Mengen der eingesetzten Aktivitäten gefunden als bei den Versuchen, bei denen C^{14} -markiertes Acetat als Substrat Verwendung fand. (0,5—1%, Mittelwert aus allen Versuchen.)

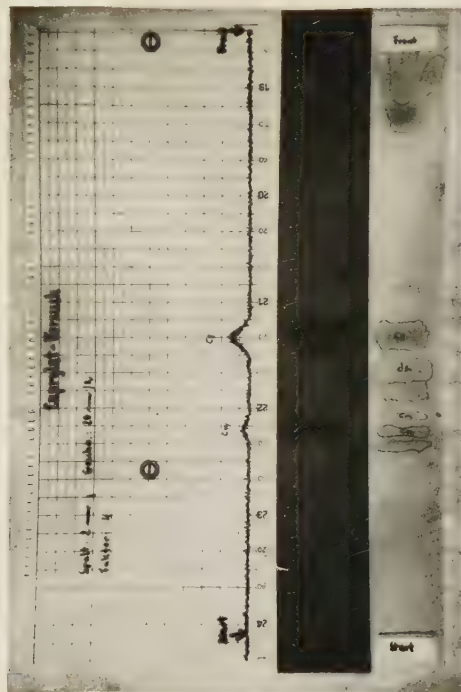
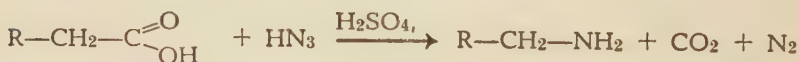


Abb. 3: Auf der Abbildung befindet sich rechts das Chromatogramm, auf dem die den getrennten Fettsäuren entsprechenden Hydroxamsäuren in Form rot-violett-gefärbter Eisenkomplexe sichtbar sind. Es erscheinen die Fettsäuren, die normalerweise das Taubenleberfett bilden, wie auch die aus den Substraten synthetisierten und daher radioaktiven höheren Fettsäuren. Außerdem erscheint noch der Teil der C^{14} -markierten Caprylsäure (C_8) der — im Überschuß vorhanden — nicht zur Synthese herangezogen wurde. Links von dem Chromatogramm ist der Röntgenfilm abgebildet, mit dem es bedeckt war, und auf dem die nicht zur Synthese herangezogene C^{14} -markierte Caprylsäure und diejenigen höheren Fettsäuren, die aus dem radioaktiven Substrat aufgebaut sind, Schwärzungen hervorgerufen haben. Ganz links die Kurve, die durch Auswertung des Chromatogramms mit dem Radiopapierchromatographen erhalten wurde.

Um die Frage zu klären, ob die bei Verwendung von 1-C¹⁴-markierter Caprylsäure als Substrat synthetisierte Palmitinsäure dadurch gebildet wird, daß sich zwei Caprylsäurereste einfach aneinanderlagern, oder ob die Bildung der Palmitinsäure auf dem Wege erfolgt, daß die Caprylsäure zuerst zu Acetatresten abgebaut wird, war es notwendig, einen Einblick in die Verteilung der radioaktiven C-Atome in dem Molekül der synthetisierten Palmitinsäure zu gewinnen. Da bei der als Substrat verwendeten C¹⁴-markierten Caprylsäure nur das C-Atom der Carboxylgruppe radioaktiv war, müßte bei der Bildung der Palmitinsäure (C₁₆) aus zwei Caprylsäureresten (C₈) das C-Atom der Carboxylgruppe der Palmitinsäure 50% der Radioaktivität des Gesamtmoleküls besitzen. Entsteht die Palmitinsäure jedoch auf dem Wege, daß die Caprylsäure zuerst zu Acetatresten abgebaut wird und aus diesen dann erst die Palmitinsäure synthetisiert wird, so wird sich eine statistisch zu erfassende gleichmäßige Verteilung der Radioaktivität auf jedes zweite C-Atom ergeben. Die Carboxylgruppe der Palmitinsäure enthält dann also nur 12,5% der Gesamtaktivität.

Um hierüber Aussagen machen zu können, wurde die bei Verwendung von 1-C¹⁴-markierter Caprylsäure als Substrat synthetisierte Palmitinsäure chromatographisch isoliert und ihre Aktivität mit Hilfe des Geigerzählers bestimmt. Nach Abbau der Carboxylgruppe der synthetisierten Palmitinsäure wurde die Radioaktivität der Carboxylgruppe und auch die des Restmoleküls gemessen.)* Um die Carboxylgruppe der Palmitinsäure abzubauen, wurde diese dem sogenannten Schmidtschen Abbau unterworfen (24). Dieser beruht auf der Einwirkung von Stickstoffwasserstoffsäure auf Carbonsäuren in Anwesenheit von Schwefelsäure in indifferenten Lösungsmitteln, wie Benzol oder Chloroform.



Versuchsgang:

Die mit Petroläther extrahierten Fettsäuren von 20 Syntheseansätzen wurden hydroxyliert und in die entsprechenden Hydroxamsäuren überführt. Die Lösungen wurden auf fünf Bögen acetylierten Papiers (18×52 cm) auf die Startlinie ohne Zwischenraum strichförmig aufgetragen. Nach beendigter Chromatographie wurden die Bögen zur Indizierung der getrennten Hydroxamsäuren mit 2%iger FeCl₃-Lösung in n-Butanol besprüht. Aus einem der Bögen wurde ein

*) Diese Versuche wurden zusammen mit H. Rehberg im Biochemischen Laboratorium des Organisch-chemischen Instituts der Technischen Hochschule München durchgeführt.

Streifen von 4 cm Breite herausgeschnitten und die Verteilung der Radioaktivität auf dem Chromatogramm mit dem Radiopapierchromatographen bestimmt. Aus dem Rest der Bögen wurden die Zonen mit der synthetisierten, radioaktiven Palmitinhydroxamsäure herausgeschnitten, in kleine Schnitzel zerkleinert und die Palmitinhydroxamsäure mit Methanol extrahiert. Als Trägersubstanz wurden zur besseren Handhabung 256 mg inaktiver Palmitinsäure hinzugefügt. Zur Verseifung der Hydroxamsäuren wurde die Lösung mit 5,6 g KOH in 10 ml H₂O eine Stunde unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde mit 30%iger Schwefelsäure angesäuert und zur vollständigen Beseitigung von Hydroxamsäuren eine Spatelspitze NaNO₂ hinzugegeben. Nach Abdampfen des Methanols wurde die Palmitinsäure durch sechsmaliges Ausschütteln mit je 10 ml Benzol extrahiert und die benzolische Lösung über Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösung wurde auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und in einem aliquoten Teil die Radioaktivität gemessen.

Abbau der Carboxylgruppe: Die benzolische Lösung der radioaktiven Palmitinsäure wurde in einen Dreihalskolben überführt, welcher mit Rührer, Gaszuführungsrohr und Rückflußkühler versehen war. Während der Reaktion wurde ständig ein schwacher CO₂-freier Stickstoffstrom durchgeleitet. Das bei der Reaktion entstehende CO₂ wurde in einer 1n NaOH absorbiert. Zur Durchführung der Reaktion wurde die Lösung mit 3 ml konz. Schwefelsäure versetzt und auf 45° C erwärmt. Es wurden nun 0,4 g NaN₃ zugegeben und unter kräftigem Rühren ein leichter CO₂-freier Gasstrom durchgeleitet. Nach 30 min wurde zur Vervollständigung der Reaktion weitere 30 min auf 50° C erhitzt. Danach wurde abgekühlt, die Schwefelsäureschicht vom Benzol abgetrennt und in Eiswasser eingetropft. Das ausgefallene Aminsulfat wurde abfiltriert und mit etwas Wasser aufgeschlämmt. Nachdem es mit 40%iger KOH alkalisch gemacht war, wurde das freie Amin ausgeäthert und in einem aliquoten Teil die Radioaktivität bestimmt.

Zur Kontrolle wurde außer der Radioaktivität des Restmoleküls auch die der bei dem Abbau der Carboxylgruppe der Palmitinsäure entstehenden CO₂ gemessen. Das bei der Reaktion entstehende CO₂ wurde durch einen CO₂-freien Stickstoffstrom in einen Absorptionsturm geleitet, welcher mit 20 ml einer 1n NaOH (karbonatfrei) beschickt war. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Inhalt des Absorptionsturmes in einen Kolben gespült und mit 5 ml einer 4n NH₄Cl-Lösung versetzt. Es wurde nun auf etwa 70° C erhitzt und mit einer 20%igen BaCl₂-Lösung im Überschuß die Fällung des Carbonats durchgeführt. Nach etwa 30 min wurde das Bariumkarbonat durch eine feinporige Fritte filtriert. Ein Teil des ausgefällten BaCO₃ wurde

in einem Achatmörser fein zerrieben und in etwas Alkohol suspendiert. 4 ml der Alkoholsuspension wurden in einen kleinen V4A-Stahlzylinder mit abschraubbarem Boden pipettiert und der Alkohol abgedampft. Der Niederschlag auf der Metallscheibe des Zylinderbodens wurde gewogen und die Radioaktivität gemessen.

<i>Tab. 3 Versuchsergebnisse:</i>	Versuch 1	Versuch 2
Gesamtaktivität der benzolischen Palmitinsäurelösung	2850±80 I/min	3440±165 I/min
Nach Durchführung des Abbaus:		
Aktivität der Aminlösung:	2575±130 I/min	2985± ? I/min
Aktivität des BaCO ₃ :	293± 83 I/min	511± 49 I/min

Aus den Versuchsergebnissen ist zu ersehen, daß sich in der Carboxylgruppe der durch Biosynthese entstandenen Palmitinsäure nur 12,6% (Mittelwert aus beiden Versuchen) der Radioaktivität des Gesamtmoleküls befinden. Aus diesem Ergebnis kann also nach den obigen Erwägungen darauf geschlossen werden, daß die Synthese der Palmitinsäure nicht durch einfache Zusammenlagerung zweier Caprylsäurereste erfolgt, sondern vielmehr über einen stufenweisen Aufbau aus Acetatresten.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Nach Angaben von R. O. Brady und S. Gurin wurde aus Taubenleber ein wasserlösliches, zellfreies Enzymsystem dargestellt, das imstande ist, C^{14} -markiertes Acetat in höhere Fettsäureketten einzubauen. In gleichsinniger Weise fanden für Versuche zur Fettsynthese auch C^{14} -markiertes Butyrat, C^{14} -markiertes Capronat, C^{14} -markiertes Caprylat Verwendung.
2. Die durch Biosynthese entstandenen Fettsäuregemische wurden papierchromatographisch analysiert. Dabei wurden die einzelnen Fettsäuren in die ihnen entsprechenden Hydroxamsäuren überführt und als solche auf acetyliertem Papier getrennt.
3. Zum Nachweis des Einbaus der genannten Substrate in höhere Fettsäuren wurden die Chromatogramme autoradiographisch ausgewertet.
4. C^{14} -markiertes Acetat wurde unter den gegebenen Bedingungen in folgende höhere Fettsäuren eingebaut: Caprin-, Laurin-, Myristin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure. Den Hauptanteil des biosynthetisch entstandenen Fettsäuregemisches bildeten Palmitin-, Stearin- und Ölsäure, wie dies auch im natürlichen Fett der Taubenleber der Fall ist.
5. C^{14} -markiertes Butyrat sowie C^{14} -markiertes Capronat wurde unter den gegebenen Bedingungen nicht zur Synthese höherer Fettsäuren herangezogen.
6. Bei Verwendung von C^{14} -markiertem Caprylat als Substrat wurden ebenfalls Palmitin-, Stearin- und Ölsäure gebildet, allerdings in geringerem Umfang als bei Verwendung von C^{14} -markiertem Acetat als Substrat. Zur Klärung des Mechanismus der Synthese der Palmitinsäure wurde die Verteilung der Radioaktivität im Palmitinsäuremolekül untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß die Synthese der Palmitinsäure nicht durch Zusammenlagerung zweier Caprylsäurereste erfolgt, sondern machen es wahrscheinlich, daß die Synthese über einen vorhergehenden Abbau der Caprylsäure zu Acetatresten stattfindet.

LITERATUR

1. R. O. Brady und S. Gurin, J. biol. Chem. 196, 421 (1952); 199, 1 (1952)
2. F. Knoop, Beitr. Chem. Physiol. Pathol. 6, 150 (1904)
3. F. Lipmann, J. biol. Chem. 160, 173 (1945)
4. E. R. Stadtmann, Federation Proc. 9, 233 (1950)
5. S. Ochoa, Physiol. Rev. 31, 56 (1951)
6. F. Lynen, E. Reichert und L. Rueff, Liebigs Ann. Chem. 574, 1 (1951)
7. F. Lynen, Angew. Chem. 63, 490 (1951)
8. F. Lynen, Angew. Chem. 17/18, 463 (1955)
9. A. L. Lehninger, J. biol. Chem. 154, 309 (1944); 157, 363 (1944); 161, 413, 437 (1945); 164, 291 (1946)
10. E. P. Kennedy, Federation Proc. 13, 241 (1954)
11. A. Kornberg und W. E. Pricer jr., J. biol. Chem. 204, 345 (1953)
12. V. v. Brand und E. Helmreich, Biochem. Ztsch. 328, 146 (1956)
13. G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfeleiderer, Z. Naturforsch. 86, 555 (1953)
14. Kostir und Slavik, Chem. Listy 44, 17 (1950); Ref. C 1951 I, 2483
15. Neimann u. Mitarb., Ber. Akad. Wiss. UdSSR 81, 841 (1951);
Ref. C 1952 V, 6263
16. Micheel und Schweppe, Naturwiss. 39, 380 (1952)
17. H. Rehberg, Diplomarbeit, Technische Hochschule München 1954
18. J. G. Hauge, F. C. Crane, H. Beinert, J. biol. Chem. 219, 717 (1956)
19. F. L. Crane, S. Mii, J. G. Haug, D. E. Green, H. Beinert, J. biol. Chem. 218, 701 (1956)
20. F. L. Crane, H. Beinert, J. biol. Chem. 218, 717 (1956)
21. H. R. Mahler, J. biol. Chem. 206, 13 (1954)
22. D. E. Green, S. Mii, H. R. Mahler, J. biol. Chem. 206, 1 (1953)
23. C. Entenman, S. R. Lerner, I. L. Chaikoff und W. G. Dauben,
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 70, 364 (1949)
24. H. Wolff, Org. Reactions III, 307 (1946)

LEBENS LAUF

Am 21. März 1932 wurde ich, Karlheinz Desing, als Sohn des kfm. Direktors Ludwig Desing und seiner Ehefrau Greta, geb. Glötzner, in Weiden/Opf., geboren.

Von 1938-42 besuchte ich die Volksschule in Weiden. 1942 trat ich an das Humanistische Gymnasium in Weiden über, wo ich im Juli 1951 das Abitur machte.

Vom Oktober 1951 bis zum Oktober 1952 war ich in der Mohrenapotheke in Weiden als Praktikant tätig. Im Wintersemester 1952 begann ich an der Universität München das Studium der Medizin. Nach 11 Semestern legte ich in der Zeit vom 3. März bis zum 21. Mai 1958 das Staatsexamen ab.

